

혈청 고밀도 지단백 직접측정법의 평가

김영아 · 임환섭 · 이정운 · 김정호 · 권오현

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실

Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol Evaluated

Young Ah Kim, M.D., Hwan Sub Lim, M.D., Jung Woon Lee, M.D., Jeong Ho Kim, M.D., and Oh Hun Kwon, M.D.

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Serum high density lipoprotein (HDL)-cholesterol level is used as an assessment of the risk of coronary heart disease. In this study, we evaluated direct measurement of HDL-cholesterol in serum with polyethylene-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin.

Methods : We evaluated the precision, the lower limit of detection, the recovery rate, the linearity, the interference for hemoglobin and the comparison with the result of HDL-cholesterol measured by selective precipitation method. We also studied the specificity of this direct method for very low density lipoprotein (VLDL) and low density lipoprotein (LDL).

Results : The total imprecision was 3.8% (low), 3.5% (middle), 3.2% (high). The lower limit of detection was 0 mg/L. The recovery rate was satisfactory. The linearity was also ($r^2=0.99$). This method showed a good correlation ($r^2=0.97$) with the selective precipitation method in HDL-cholesterol measurement. VLDL-cholesterol (up to 300 mg/L) increased HDL-cholesterol only less than 3% but increased VLDL-cholesterol to 400 mg/L, more than 750 mg/L caused 5% and 15% of overestimation of HDL-cholesterol, respectively. LDL-cholesterol (142-1,073 mg/L) increased or decreased HDL-cholesterol by some degree (about 15%). Hemoglobin (up to 3,000 mg/L) did not influence this assay.

Conclusions : The direct measurement of HDL-cholesterol is satisfactory method in HDL-cholesterol measurement in good analytical performance and may be anticipated to reduce workload of laboratory because the sample pretreatment is not necessary. (*Korean J Clin Pathol* 1998; 18: 529-33)

Key words : HDL-cholesterol, Polyethylene glycol-modified enzymes, Sulfated α -cyclodextrin, Direct measurement

서론

고밀도 지단백(high density lipoprotein, HDL)은 말초 조직에서 간으로 콜레스테롤의 이동에 관여하는 물질로서 관상동맥질환의 보호인자(protective factor)임은 잘 알려져 있는 사실이다[1]. 신장 투석환자, 당뇨병환자와 협심증환자 등 지질대사 이상으로 관상동맥 질환의 위험성이 높은 환자 등에서 주로 측정하고 있으며 최

근 의뢰 건수가 빠르게 증가하고 있다. 식생활의 서구화로 관상동맥질환의 증가하고 있는 추세이므로 그 측정의 필요성은 계속 증가 하겠다. HDL 콜레스테롤 측정방법 중 가장 널리 사용되어왔던 방법은 선택적 침전법(selective precipitation method)으로 본원에 서도 과거 이 방법을 이용하여 HDL 콜레스테롤을 측정하여 왔다. 그러나 원심분리 과정이 필요하여 측정시간이 오래 걸리며, 많은 검체의 처리나 자동화에는 문제점이 있다. 그 외에도 apo B를 함유하고 있는 지단백(lipoprotein)을 침전시키는 효율성 등에 따라 HDL 콜레스테롤의 값이 영향을 받을 수 있다는 단점이 있다[2]. 최근에 소개되고 있는 HDL 콜레스테롤의 직접측정법은 polyethylene glycol (PEG)로 변형시킨 cholesterol esterase가 각각의 지단백에 활동성이 다른 것을 이용한 것으로 이런 활동성의 차이가

접 수 : 1998년 3월 20일

접수번호 : KJCP1138

수정본접수 : 1998년 9월 8일

교신저자 : 김영아

우 120-752 서울 서대문구 신촌동 134

신촌세브란스병원 임상병리과

전화 : 02-361-6495, Fax : 02-364-1583

마그네슘 이온(magnesium ion)과 α -cyclodextrin sulfate 존재 시 더욱 뚜렷해져 다른 지단백의 침전 없이도 HDL 콜레스테롤을 직접 측정할 수 있다[3]. 본 연구에서는 Determiner-L HDL-C (Kyowa Medix Co. Ltd., Japan)를 사용한 직접측정법의 정밀도, 회수율 등을 평가하고 Spectrum (Abbott, U.S.A.)을 이용한 기존의 침전법과 비교하여 보았다.

재료 및 방법

1. 재료

HDL 콜레스테롤 침전제는 dextran sulfate, Mg^{++} (Spectrum, Abbott, U.S.A.)을 사용하였고, HDL 콜레스테롤 직접측정법은 polyethylene glycol (PEG)-modified enzyme, α -cyclodextrin sulfate, Determiner-L HDL-C (Kyowa Medix, Japan)를 사용하였다.

정밀도의 평가에는 정도관리 물질을 사용하였고 비교를 위해서는 세브란스 병원에 의뢰된 환자 109명의 혈액을 실온에서 응고시킨 후 3,200 rpm에서 5분간 원심분리한 혈청을 사용하였다.

2. 측정 원리

1) 선택적 침전법

Dextran sulfate와 마그네슘 이온이 최저밀도 지단백(very low density lipoprotein, VLDL)과 저밀도 지단백(low density lipoprotein, LDL)만을 선택적으로 침전시키므로 HDL은 상층액에 남아있게 된다. 원심분리로 상층액을 얻어서 자동화학 분석기(Hitachi 747, Japan)로 흡광도 600 nm에서 콜레스테롤을 측정하여 HDL 콜레스테롤을 측정한다.

2) 직접측정법

화학적으로 변형시킨 cholesterol esterase와 cholesterol oxidase는 다른 지단백에 비해 HDL에 대한 활동성이 크다. 특히, dextran sulfate와 α -cyclodextrin sulfate가 있으면 HDL만을 가용화시키고 그 외의 유미지질(chylomicron), VLDL 및 LDL은 계면활성제와 복합체가 형성되어 효소의 반응에서 차단되므로 선택적으로 HDL 콜레스테롤만을 측정할 수 있다. 측정기기는 자동화학 분석기(Hitachi 747, Japan)를 사용하여 흡광도 600 nm에서 측정하였다.

3. 방법

1) 정밀도의 평가

저농도(200 mg/L), 중간농도(400 mg/L), 고농도(500 mg/L)의 기준물질을 사용하여 NCCLS기준에 따라 5일간 측정하였다[4].

2) 최소농도검출한계치

Zero calibrator를 20회 반복 측정하였다.

3) 회수율(recovery rate)

430 mg/L의 정도관리 물질과 290 mg/L의 검체를 2:1, 1:1, 1:2로 혼합하여 2회 반복 측정하였다. 또 환자혈청을 초고속 원심분리기(Hitachi CP65 β , Japan)로 P55ST2 rotor를 사용하여 32,000 rpm으로 16시간 초고속 원심분리하여 얻은 HDL 콜레스테롤(560 mg/L)을 9% NaCl로 2배수 희석하여 만든 560, 280, 140, 70 mg/L 농도의 순수한 HDL 콜레스테롤 용액을 290 mg/L 환자 검체와 2:1로 혼합하여 2회 반복 측정하였다.

4) 직선성(linearity)의 평가

환자혈청을 초고속 원심분리하여 얻은 560 mg/L의 HDL 콜레스테롤을 9% NaCl로 2배수 희석하여 만든 70-560 mg/L의 HDL 콜레스테롤을 290 mg/L 환자검체와 2:1로 혼합하여 2회 반복 측정하여 결정계수를 구하였다.

5) 비교방법과 상관성

검사가 의뢰된 혈청 검체 중 저농도, 중간농도, 고농도의 HDL 콜레스테롤을 모두 포함한 109개의 검체를 선택적 침전법인 Spectrum (Abbott, U.S.A.)과 직접측정법인 Determiner-L HDL-C (Kyowa, Japan)를 사용하여 두 방법간의 상관성을 살펴보았다.

6) 특이성(specificity)

초고속 원심분리기를 사용하여 얻은 3,870 mg/L의 VLDL 콜레스테롤과 1,610 mg/L의 LDL 콜레스테롤을 사용하였다.

250 mg/L의 환자혈청에 100 mg/L에서 1,000 mg/L의 농도로 VLDL 콜레스테롤을 첨가한 후 HDL 콜레스테롤을 2회 반복 측정하였다. 또 LDL 콜레스테롤이 HDL 콜레스테롤 측정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 200 mg/L의 환자혈청에 초고속 원심분리로 얻은 LDL 콜레스테롤을 9% NaCl로 희석하여 만든 다양한 농도의 LDL 콜레스테롤을 혼합하여 HDL 콜레스테롤을 2회 반복 측정하였다.

7) 혈색소에 의한 간섭

농도 33,000 mg/L의 혈색소 용액을 환자의 검체에 최고 혈색소 3,000 mg/L에서 최저 200 mg/L까지의 농도로 혼합하여 HDL 콜레스테롤을 2회 반복 측정하였다.

4. 통계 처리

정밀도의 평가에서는 변이계수를 구했으며, 회수율은 계산값을 기준으로 %를 구하였다. 직선성과 두 방법간의 상관성을 알아보기 위해서 결정계수와 회귀방정식을 구하였다. 특이성과 혈색소에 의한 간섭은 간섭물질에 의한 희석의 영향만 있을 때 예상되는 농도를 100으로 하여 측정치의 %를 구하였다.

Table 1. Recovery rate of the direct HDL-cholesterol method with homogeneous HDL-cholesterol

HDL-C added (mg/L)	560	280	140	70
HDL-C expected (mg/L)*	470	283	190	143
HDL-C measured (mg/L)	480	300	200	170
%	102.1	105.9	105.3	118.6

*The expected HDL-C concentration when one volume of patient serum (290 mg/L) was mixed with two volume of purified HDL-C (HDL-C added).

결 과

1. 정밀도의 평가

기준물질을 사용해 평가한 총 정밀도는 저농도 3.8%, 중간농도 3.5%, 저농도 3.2%이었다.

2. 측정한계치

Zero calibrator를 사용한 측정한계치는 0 mg/L이었다.

3. 회수율

정도관리 물질과 검체를 2:1, 1:1, 1:2로 혼합하여 측정시 각각 96.6%, 102.9%, 99.0%의 회수율을 보였다. 초고속 원심분리하여 얻은 순수한 HDL 콜레스테롤을 검체와 2:1로 혼합하여 측정한 경우도 102.1-118.6%이었다(Table 1).

4. 직선성

결정계수 $r^2=0.99$ 로 직선성이 좋았다(Fig. 1).

5. 비교 방법과 상관성

109개의 혈청 검체를 비교해 본 결과 침전법과 직접법간의 결정계수는 $r^2=0.97$, 회귀방정식은 $y=1.08x-2.06$ 으로 상관성이 좋았다(Fig. 2).

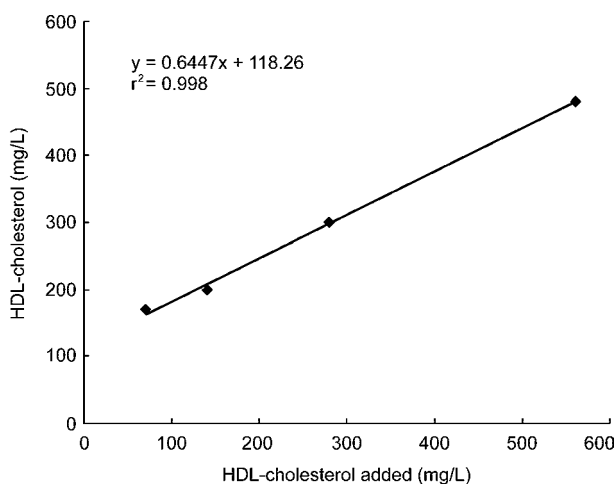


Fig. 1. Linearity of the direct HDL-cholesterol method.

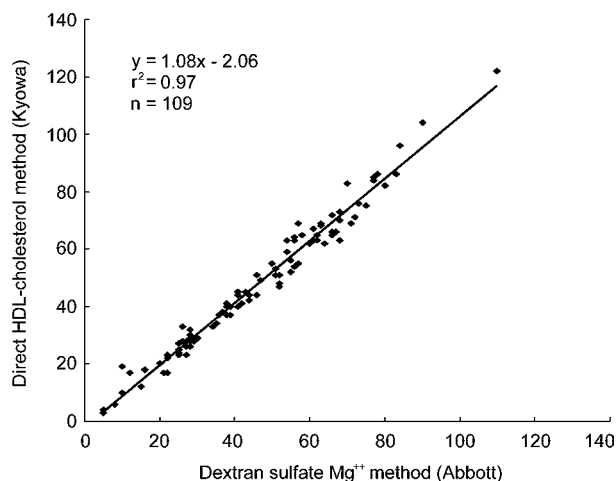


Fig. 2. Comparison of the direct HDL-cholesterol method (Kyowa Medix, Japan) vs. the dextran sulfate-Mg⁺⁺ method (Spectrum, Abbott).

6. 특이성

VLDL 콜레스테롤은 300 mg/L까지 HDL 콜레스테롤 측정에 영향을 미치지 못했다(Fig. 3).

LDL 콜레스테롤(142-1,073 mg/L)은 HDL 콜레스테롤 측정에 $\pm 15\%$ 영향을 미쳤다(Fig. 4).

7. 간섭

혈색소는 3,000 mg/L까지 영향을 미치지 못했다(Fig. 5).

고 찰

혈청의 지단백은 밀도에 따라 최저밀도 지단백, 저밀도 지단백, 고밀도 지단백 및 유리지질로 나뉜다. 고밀도 지단백질이 받아들인 유리 콜레스테롤은 동맥벽을 포함한 말초조직에서 lecithin-

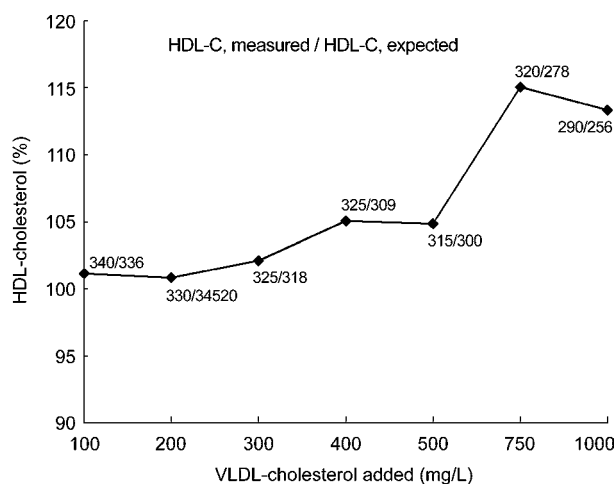


Fig. 3. Specificity of the direct HDL-cholesterol method in the presence of VLDL-cholesterol.

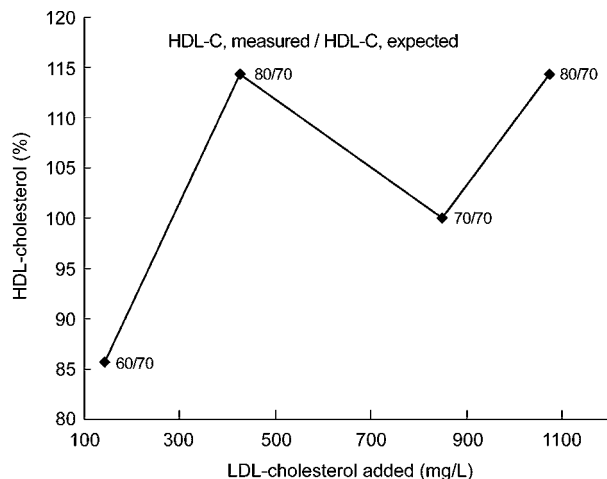


Fig. 4. Specificity of the direct HDL-cholesterol method in the presence of LDL-cholesterol.

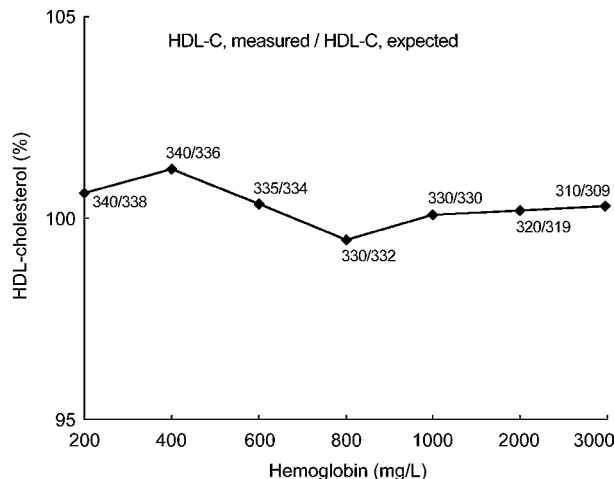


Fig. 5. Interference of hemoglobin with the direct HDL-cholesterol method.

cholesterol-acyl-transferase (LCAT)에 의해 에스터화(esterification)되어 간에서 흡수되거나, cholesteryl ester transfer protein (CETP)에 의해 apo B를 포함하고 있는 지단백으로 이동하므로 고밀도 지단백은 말초에서 간이나 다른 지단백으로 콜레스테롤을 이동시키는 역할을 한다. 고밀도 지단백이 35 mg/dL 이하이면 죽상동맥 질환에 걸리기 쉽다는 것은 잘 알려져 있다[5]. 따라서 관상동맥질환의 고위험군에서 고밀도 지단백의 측정이 필요하다.

지금까지 알려져 있는 고밀도 지단백의 측정법에는 초고속 원심분리[6], 지단백 전기영동법[7], 선택적 침전법[2, 8-11] 등이 있다. 초고속 원심분리법은 참고방법이나 고가의 장비와 대량의 검체가 필요하고, 검사 소요시간이 길며, 검사 과정 중 지질의 과산화의 위험이 있으며 원심력이 각각의 분획에 영향을 준다[6]. 지단백 전기영동법은 cellulose acetate, agarose, polyacrylamide[7] 등의 지지체를 사용하여 전기영동으로 지단백을 분리한 후 oil red O, sudan black 등의 염색약을 처리하여 밀도측정기(densitometry)로 상대적 분획을 구하여 농도를 결정하는 방법이다. 이 방법은 임상적으로 중요한 농도 범위에서는 정밀도가 부족하기 때문에 주로 연구 목적에 사용되고 있다.

검사실에서 가장 많이 사용하는 방법은 선택적 침전법으로 침전제를 사용하여 apo B를 함유하는 지단백을 선택적으로 침전시키고 상층액에서 고밀도 지단백을 효소적 방법으로 측정하는 것이다[2, 8-11]. 침전제 중 heparin/manganese chloride, phosphotungstate/magnesium chloride, dextran sulfate/magnesium chloride, polyethylene glycol을 사용한 침전법과 초원심분리법을 비교하여 apo B를 포함하는 지단백 제거 효율성을 비교해 보았을 때, phosphotungstate/magnesium chloride와 polyethylene glycol이 가장 좋다는 보고가 있다[11].

선택적 침전법은 초고속 원심분리기 같은 고가의 장비가 필요하지 않고 지단백 전기영동법에 비해 정밀도가 좋으나, 검체 처리량이 많아지고 자동화가 요구되는 현재의 시점에서는 시간과 노력이 많이 소모되는 원심분리 과정이 자동화 과정에 장애가 된다. 또한

dextran sulfate를 침전제로 사용한 경우 남아있는 침전제가 콜레스테롤 측정에 영향을 준다는 보고도 있다[12]. 따라서 혈청내에 고밀도 지단백을 직접 측정하는 방법이 필요하게 되었다. 직접측정법으로는 전자기적으로 반응하는 다가음이온-금속(polyanion-metal)을 결합시켜 측정하는 방법[13], PEG-modified enzyme과 sulfated α -cyclodextrin을 사용하는 방법[3], ^1H NMR spectrophotometry를 사용하여 혈장에서 지질과 단백질을 측정하는 방법[14] 및 chromatography를 이용한 방법 등이 있다[15]. PEG-modified enzyme과 sulfated α -cyclodextrin을 사용하는 방법은 PEG로 처리한 cholesterol esterase나 cholesterol oxidase같은 효소가 지단백의 종류에 따라 활성도의 차이를 보이는 것을 이용한 것이다. PEG처리한 효소는 고밀도 지단백, 유미지질이나 초저밀도 지단백, 저밀도 지단백의 순으로 효소의 활성을 보이며, α -cyclodextrin sulfate가 마그네슘 이온이 있으면 유미지질, 초저밀도 지단백에 대한 효소 활성을 더욱 감소시킨다[3]. α -Cyclodextrin의 수소기(hydroxy group)는 황화(sulfation)되어서 유미지질과 초저밀도 지단백에 선택적으로 작용하는데 단백질의 양전하된 곳에 반응하여 불용성 화합물을 형성하므로[3] 약간의 dextran sulfate와 α -cyclodextrin sulfate 그리고 PEG 처리된 효소를 사용하여 지단백의 침전과정 없이 고밀도 지단백을 선택적으로 측정할 수 있다[3]. 기전은 명확하지 않지만 PEG로 변형된 효소에서 보이는 이러한 선택성은 단순히 특정한 단백질의 응집에 의한 것은 아니라 밀도, 충전하, 크기에 따라 각각의 지단백을 인식하는 것으로 생각된다[3].

본 연구에서는 고, 중, 저 농도에서 총정밀도가 모두 4% 이내로 매우 우수하였고 회수율도 좋았다. 혈색소에 의한 간섭은 3,000 mg/L까지 없었다. Nauck 등[16]은 유사한 HDL콜레스테롤 측정 시 LDL콜레스테롤 500 mg/L, 총 콜레스테롤 3,500 mg/L, VLDL콜레스테롤 250 mg/L, 중성지방 3,800 mg/L이상시 HDL콜레스테롤이 높게 측정되므로 주의해야 한다고 하였다. 본 연구에서도 VLDL콜레스테롤 300 mg/L까지 3% 미만의 증가만을 보였

으며 LDL콜레스테롤의 경우 1,073 mg/L까지 $\pm 15\%$ 이내의 오차를 보였다. 혈청 고밀도 지단백 직접측정법은 기존의 방법과의 상관성이 좋으며 전처리 과정 없이 간편하게 사용할 수 있는 방법이라 생각된다.

요 약

배경: 고밀도 지단백의 측정은 관상동맥 질환의 고위험군을 알아내는데 유용한 검사이다. 지금까지 흔히 사용한 선택적 침전법에 의한 고밀도 지단백의 측정방법의 단점을 보완하는 직접측정법에 대하여 알아보았다.

방법: 기준물질을 사용하여 고, 중, 저농도에서의 총 정밀도를 구하였고, 환자의 혈청 109검체로 선택적 침전법과 직접측정법의 상관성을 비교하였다. 측정한계치는 분석물질이 존재하지 않는 검체를 20번 반복 측정하였다. 회수율, 직선성 및 혈색소에 의한 간섭도 알아보았다. 고밀도 지단백에 대한 특이성을 최저밀도 지단백과 저밀도 지단백을 단계별로 첨가하여 검토하였다.

결과: 정밀도는 모두 변이계수 4% 이내이었고, 선택적 침전법과 직접측정법의 상관성은 $y=1.08x-2.06$, 결정계수 $r^2=0.97$ 로 좋았다. 측정한계치는 0 mg/L이었고, 직선성과 회수율도 좋았다. 최저밀도 지단백은 300 mg/L까지 고밀도 지단백 측정에 영향을 미치지 않았지만 저밀도 지단백(142-1,073 mg/L)은 $\pm 15\%$ 미만의 오차를 보였다. 혈색소에 대한 간섭은 3,000 mg/L까지 없었다.

결론: 고밀도 지단백의 직접측정법은 전처리 과정이 필요없어 검사 소요시간과 인력의 소모를 줄일 수 있으며 종래의 방법을 대체할 수 있는 유용한 검사로 생각된다.

참고문헌

- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. *The Framingham Study*. *Am J Med* 1977; 62: 707-14.
- Warnick GR, Cheung MC, Albers JJ. Comparison of current methods for high-density lipoprotein cholesterol quantitation. *Clin Chem* 1979; 25: 596-604.
- Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N,

- et al. Direct measurement of high density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. *Clin Chem* 1995; 41: 717-23.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS proposed guideline EP10-T. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory methods: tentative guideline. 2nd ed. Villanova, PA, 1993: 1-193.
- Warnick GR and Wood PD. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. *Clin Chem* 1995; 41: 1427-33.
- Leonhardt W, Pietzsch J, Nitzsche S. Very-fast ultracentrifugation of human plasma lipoproteins: influence of the centrifugal field on lipoprotein composition. *Clin Chim Acta* 1994; 224: 21-32.
- Roche D, Atger V, Le-Quang NT, Girard A, Ekindjian OG. Polyacrylamide gel electrophoresis in quantification of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1985; 31: 1893-5.
- Assmann G, Schriewer H, Schmitz G, Hagele EO. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl₂. *Clin Chem* 1983; 29: 2026-30.
- McNamara JR, Huang C, Massov T, Leary ET, Warnick GR, Rubins HB, et al. Modification of the dextran-Mg²⁺ high-density lipoprotein cholesterol precipitation method for use with previously frozen plasma. *Clin Chem* 1994; 40: 233-9.
- 우재은 및 이도훈. HDL-cholesterol 침전법의 방법별 비교평가. 대한 임상병리학회지 1995; 15: 571-82.
- Demacker PN, Vos-Janssen HE, Hijmans AG, van't Laar A, Jansen AP. Measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum: comparison of six isolation methods combined with enzymic cholesterol analysis. *Clin Chem* 1980; 26: 1780-6.
- Olmos JM, Lasuncion MA, Herrera E. Dextran sulfate complexes with potassium phosphate to interfere in determinations of high-density lipoprotein in cholesterol. *Clin Chem* 1992; 38: 233-7.
- Musto JD. HDL-cholesterol: online separation and analysis utilizing an automated chemistry analyzer [abstract]. *Clin Chem* 1993; 39: 1125-6.
- Ala-Korpela M, Korhonen A, Keisala J, Horkko S, Korpi P, Ingman LP, et al. ¹H NMR-based absolute quantification of human lipoproteins and their lipid contents directly from plasma. *J Lipid Res* 1994; 35: 2292-304.
- Marz W, Siekmeier R, Scharnagl H, Seiffert UB, Gross W. Fast lipoprotein chromatography: new methods for plasma lipoproteins. *Clin Chem* 1993; 39: 2276-81.
- Nauck M, Marz W, Haas B, Wieland H. Homogeneous assay for direct determination of high-density lipoprotein cholesterol evaluated. *Clin Chem* 1996; 42: 424-9.